

# COMPOUNDS ALKYLATING SPECIFIC BASE SEQUENCE OF DNA AND METHOD FOR SYNTHESIZING THE SAME

**Patent number:** WO0015641  
**Publication date:** 2000-03-23  
**Inventor:** SUGIYAMA HIROSHI (JP); TAO ZHI FU (JP); SAITO ISAO (JP)  
**Applicant:** JAPAN SCIENCE & TECH CORP (JP); SUGIYAMA HIROSHI (JP); TAO ZHI FU (JP); SAITO ISAO (JP)  
**Classification:**  
 - International: **C07D487/04; C07D487/10; C07D487/00;** (IPC1-7): C07D487/08; A61K31/40; A61K31/415; A61K48/00; C12N15/01  
 - european: C07D487/04; C07D487/10  
**Application number:** WO1999JP01228 19990312  
**Priority number(s):** JP19980260710 19980914

Also published as:



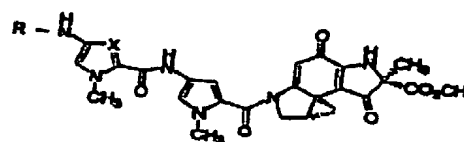
US6566336 (B1)  
 JP2000159768 (A)

BEST AVAILABLE COPY

Report a data error here

## Abstract of WO0015641

Compounds capable of recognizing a minor group in a hydrogen bond of base pairs and covalently binding to a base. These compounds recognize a specific base sequence and strongly bind to the adjacent base via a covalent bond, thus regulating the expression of a gene carrying the above base sequence. The above compounds are represented by general formula (I), wherein R represents lower alkyl or polyamido; and X represents nitrogen or CH. Agents for alkylating genes which contain the above compounds.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 1)

(11) 特許番号

特許第3045706号

(P3045706)

(45) 発行日 平成12年5月29日 (2000. 5. 29)

(24) 登録日 平成12年3月17日 (2000. 3. 17)

(51) IntCl<sup>1</sup>

識別記号

F I

C 0 7 D 487/04

1 3 7

C 0 7 D 487/04

1 3 7

A 6 1 K 31/407

A 6 1 K 31/407

31/4178

31/4178

48/00

48/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

請求項の数11(全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平10-260710

(22) 出願日

平成10年9月14日 (1998. 9. 14)

審査請求日

平成11年9月10日 (1999. 9. 10)

特許法第30条第1項適用申請有り 日本化学会第74春季  
 年会講演予稿集▲ I I ▼ (平成11年3月14日)、社団法人  
 日本化学会発行、3 G309に発表

(73) 特許権者 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 杉山 弘

静岡県静岡市馬淵4丁目6-5

(72) 発明者 陶 志福

東京都江東区森下4-17-13-502

(72) 発明者 斎藤 烈

京都府京都市山科区勸修寺柴山1-21

(74) 代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

審査官 吉住 和之

最終頁に続く

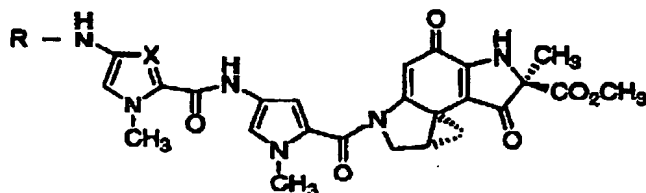
(54) 【発明の名称】 DNAの特定塩基配列をアルキル化する化合物及びその合成法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式(1)

\* 【化1】

\*



[式中、Rは低級アシル基、又はN-メチルピロール

環、N-メチルイミダゾール環及び/又はア-リンカー

3

( $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ )を含有するポリアミド基を示し、Xは窒素原子又はCHを示す。]で表される化合物。

【請求項2】 Rがアセチル基である請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 RがN-メチルピロール環及び/又はN-メチルイミダゾール環を含有するポリアミド基である請求項1に記載の化合物。

【請求項4】 Rが、 $\gamma$ -リンカー( $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ )を含有するポリアミド基である請求項1に記載の化合物。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の化合物からなる遺伝子のアルキル化剤。

【請求項6】 アルキル化のために認識される塩基配列が、W-W-V(式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)又はG-W-V(式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)である請求項5に記載のアルキル化剤。

【請求項7】 さらに、ディスタマイシンと組み合わせて使用されることを特徴とする請求項5又は6に記載のアルキル化剤。

【請求項8】 請求項5～7のいずれかに記載のアルキル化剤を含んで成る、遺伝子の特異的な塩基配列を包含する部分の発現を制御する遺伝子発現制御剤。

【請求項9】 遺伝子の特異的な塩基配列を包含する部分が、生物の疾患を誘発する遺伝子である請求項8に記載の発現制御剤。

【請求項10】 生物の疾患を誘発する遺伝子が、癌遺伝子である請求項9に記載の発現制御剤。

【請求項11】 請求項1～4のいずれかに記載の化合物を含有してなる、遺伝子により誘発され得る疾患を治療又は予防するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子をアルキル化することができる化合物、その化合物を用いたアルキル化剤、そのアルキル化剤を用いて遺伝子の発現を制御する方法、及び、当該化合物を含有してなる医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】分子生物学の急速な進歩により、がんをはじめさまざまな疾病の原因がDNAの変異であることが次々と明らかにされてきている。また、ヒューマンゲノムプロジェクトによりヒトDNAの全塩基配列の決定も数年以内に完了するものとみられ、これら疾病の分子レベルの理解に基づいた治療法の出現がますます望まれてきている。しかし細胞の外から遺伝子の発現を制御する一般的な方法論が確立していないことが、このようなアプローチの実現の大きな壁になっている。最近、ディスタマイシンなどの抗生物質によるDNAの分子認識

4

をヒントとして、塩基配列特異的に結合する分子が設計され、遺伝子発現の制御が可能になってきた。

【0003】三日月型をしたディスタマイシン、ネトロブシンなどの抗生物質が、DNAのアデニン・チミン(A・T)塩基対に富む配列のA-T間の水素結合のマイナーグループに結合することがX線結晶構造解析やNMRにより明らかにされ、この認識を利用したさまざまな分子が合成されてきた。ピロール環をイミダゾールに変えることにより、グアニン・シトシン(G・C)塩基対を認識するように改変できることについては以前から予想されていたが(M.L.Kopka,C.Yoon,D.Goodsell,P.Pijura,R.E.Dickerson,Proc.Natl.Acad.Sci,USA,82,1376,(1985));(J.W.Lown,K.Krowicki,U.G.Bhat,A.Skorobogaty,B.Ward,J.C.Dabrowski,Biochemistry,25,7408(1986).)、実際にはそう単純ではなく、多くの混沌とした実験結果が得られていた。

【0004】Wemmerらは、ディスタマイシンによるDNAへの結合についてNMRを用いて詳細に検討した。その結果、これまで1枚しか収容されないと考えられていたDNAマイナーグループにディスタマイシンが2枚入りうることを示した(J.G.Pelton,D.E.Wemmer,Proc.Natl.Acad.Sci,USA,86,5723(1989).)。Dervanらはこのような結合モードを考慮すると、いままでの混沌とした結果が説明できることに着目し、アンチパラレルに配向したメチルピロール(Py)、メチルイミダゾール(Im)ポリアミドのペアにより2本鎖DNAの塩基配列が認識できることを見いだした。

【0005】すなわち、Py-ImによりC-G塩基対が、Im-PyによりG-C塩基対が、Py-PyによりA-TまたはT-A塩基対を認識するという一般則を導きだしたのである(S.White,E.E.Baird,P.B.Dervan,Chemistry&Biology,4,569(1997).)。ペアに共有結合を導入して、結合におけるエントロピー損失を防ぎ、より強い結合と認識能を得るためいろいろなヘアピンや環状のポリアミドが合成された。なかでも $\gamma$ -リンカー( $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ )をもつヘアピンがすぐれた結合能と認識能をもつことが示され、そのDNAとの複合体の構造も決定されている(R.P.L.de Clairac,B.H.G.eierstanger,M.Marksich,P.B.Dervan,D.E.Wemmer,J.Am.Chem.Soc.,119,7909(1997).)。

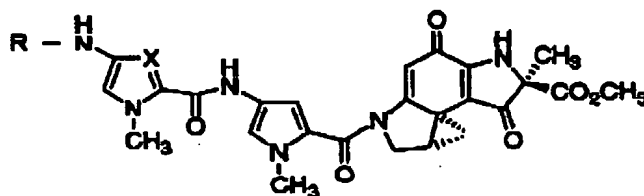
【0006】また、ピロールイミダゾールのみでつくられるヘアピンポリアミドでは認識可能な配列は7塩基対が上限であるが(J.M.Turner,E.F.Baird,P.B.Dervan,ibid.,119,7636(1997).)、ホモダイマーを用いた系においてA・T配列を認識する $\beta$ -アラニン-ペアの導入で11塩基対の認識も可能になっている(S.E.Swallley,E.E.Baird,D.B.Dervan,Chem.Enr.J,3,1600(1997).)。

【0007】さらに、Dervan,GottesfeldらはZnフィンガータンパクであるTFIIIAの認識配列中の4番目のフィンガーの結合配列のマイナー

グループに拮抗して結合するポリアミドを設計し5 SRNAの発現が *in vitro* の実験において選択的に制御されることを示した (J.M.Gottesfeld, L.Neely, J.W.Trauger, E.E.Baird, P.B.Dervan, Nature, 387, 202 (1997)). また、同時に *in vitro* の実験において、ポリアミドが核内に透過していることも示された。

【0008】近年、遺伝子の制御に関して、オリゴヌクレオチドやペプチド核酸 (PNA) などが注目されているが、細胞透過性が問題となっていることを考えると、これらメチルピロール-メチルイミダゾールポリアミド 10 は遺伝子発現を制御する分子として、分子生物学の道具として、さらには医薬としても期待がもてる化合物であることが示されてきた。

【0009】従来の Py-Im 系のポリアミドは、塩基\*



【式中、Rは低級アシル基、又はN-メチルピロール環、N-メチルイミダゾール環及び/又はγ-リンカー (−NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO−) を含有するポリアミド基を示し、Xは窒素原子又はCHを示す。】で表される化合物に関する。

【0013】また、本発明は、前記一般式 (1) で表される化合物からなる遺伝子のアルキル化剤に関する。より詳細には、本発明のアルキル化剤は、遺伝子中の特異的な塩基配列、W-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。) 又はG-W-V (式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。) などの配列を認識して当該部分を選択的にアルキル化することができるものである。さらに、本発明は、前記のアルキル化剤を含んで成る、遺伝子の特異的な塩基配列を包含する部分の発現を制御する遺伝子発現制御剤に関する。また、本発明は、前記一般式 (1) で表される化合物を含有してなる、遺伝子により誘発され得る疾患を治療又は予防するための医薬組成物にも関する。

【0014】本発明の一般式 (1) におけるRの低級アシル基としては炭素数1~12、好ましくは2~6の低級アシル基であり、例えば、アセチル基、n-プロピオニル基、イソプロピオニル基、n-ブタノイル基などが挙げられるが、立体的に小さなものが好ましい。

【0015】また、RのN-メチルピロール環、N-メ

\* 対の水素結合のマイナーグループを認識するだけであり、遺伝子と共有結合するものではなかった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、塩基対の水素結合のマイナーグループを認識すると共に、塩基と共有結合をし得る化合物を提供する。本発明の化合物は、特定の塩基配列を認識すると共に、隣接する塩基と共有結合により強固に結合し、当該塩基配列を有する遺伝子の発現を制御することができる。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、次式 (1)

【0012】

【化2】

チルイミダゾール環及び/又はγ-リンカー (−NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO−) を含有するポリアミド基としては、N-メチル-4-アミノ-2-カルボキシピロール (HO-Py-H)、N-メチル-4-アミノ-2-カルボキシイミダゾール (HO-Im-H)、4-アミノ酪酸 (HO-γ-H) (γ-リンカー用) などのアミノカルボン酸からなるポリアミド基が挙げられる。これらのポリアミド基のアミドの窒素-水素結合の部位が、遺伝子の塩基を認識し、即ち、一般的には Py-Im は C-G 対を認識し、Im-Py は G-C 対を認識し、Py-Py は A-T 対又は T-A 対を認識することから、認識させたい塩基配列に応じて、前記ポリアミド基を設計することができる。

【0016】Rにおけるポリアミド基のアミドは、遺伝子の塩基対の片側に対して5~7個、好ましくは3個までのものが好ましく、それ以上のアミド基を有することもできるが、塩基配列に対する親和性の向上を期待することは難しい。好ましいポリアミド基としては、N-メチル-4-アセチルアミノ-イミダゾール-2-カルボニル基が挙げられる。

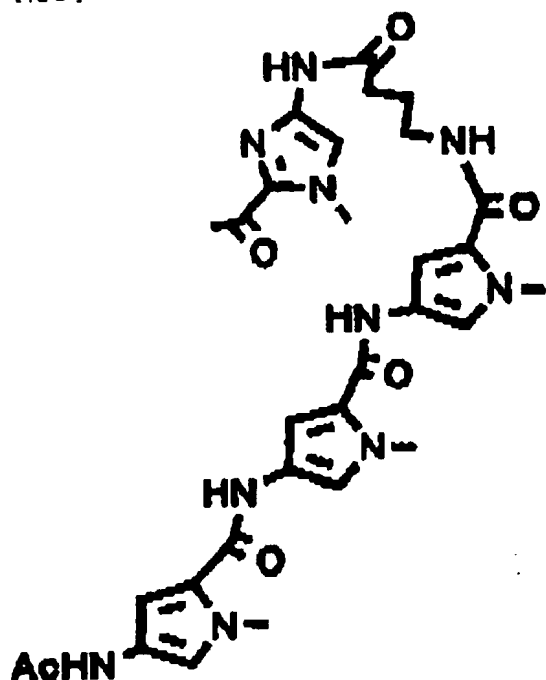
【0017】Rにおけるポリアミド基中のγ-アミノ酪酸部分は、γ-リンカーとして作用するものであり、この部分でポリアミド鎖がヘアピンカーブして、遺伝子の塩基対の対になっている塩基配列を認識することにな

7

る。本発明の一般式(1)におけるRのN-メチルピロール環、N-メチルイミダゾール環及び/又はァーリンカー(-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-)を含有するポリアミド基としては、次式

【0018】

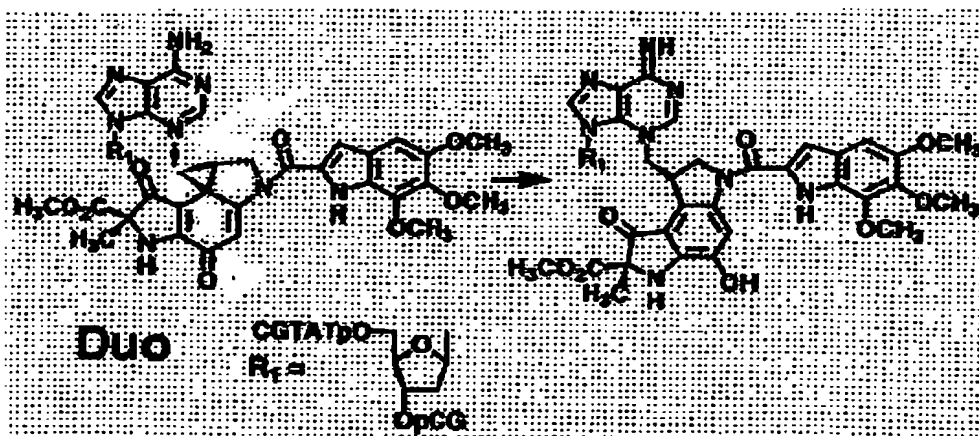
【化3】



10

20

\*



【0022】しかしながら、デュオカルマイシンAのアルキル化はアデニン(A)のプリン環でのみ生起するのに対して、本発明の化合物のアルキル化はアデニン(A)又は(G)のいずれのプリン環においても生起する点で相違がある。

【0023】本発明の化合物のアミド結合に続くPy-Py-の部分は、遺伝子の塩基配列W-W(Wは、A若しくはT又はUを示す。)を認識配列とし、Im-Py

\*【0019】で示されるものが特に好ましい。

【0020】本発明の一般式(1)で表される化合物のアルキル化部分は、次式で示されるデュオカルマイシンA(DuocarmycinA)のアルキル化機構と同様な機構でアルキル化する。

【0021】

【化4】

の部分は遺伝子の塩基配列のG-W(Wは、A若しくはT又はUを示す。)を認識配列としている。したがって、本発明の化合物は次式(II)又は(III)

W-W-V (II)

G-W-V (III)

(式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)の塩基配列を認識し、塩基V(A又はG)の部分で遺伝子と共有結合を形成するものである。

50

【0024】しかしながら、本発明のアルキル化剤はこれらの塩基配列に制限されるものではなく、前述したように標的とする塩基配列を必要に応じて設計することができる。また、前述したRの部分に置いて、さらにポリアミド結合を延ばすことにより、認識できる塩基配列をさらに延ばすことができる。

【0025】本発明の一般式(1)で表される化合物は、例えば、図1(図1は、Rがアセチル基の場合を示す。)に示す方法で製造することができる。本発明の化合物のアルキル化部分は、デュオカルマイシンB2(Duo B2)を原料として図1に示す方法により製造でき、これを別に製造されたピロールカルボン酸誘導体を用いてアミド化することにより製造される。より具体的な製造例を後述する実施例において例示する。

【0026】本発明の化合物のひとつであるXが窒素原子でRがアセチル基の化合物(以下、IPDuという。)を用いて、8塩基の種々のオリゴヌクレオチドとの認識をした結果を図2に示す。図2に示す試験は、本発明の化合物IPDuとディスタマイシンを使用したものであり、本発明の化合物を●-○-△で示し、ディスタマイシンを+)-◇-○-○-○で示している(図中では、○が灰色で示されている。)。そして、本発明の化合物の△印で示されている部分で遺伝子と共有結合をしている。

【0027】前述したように、IPDuはG-W-V(式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)の塩基配列を認識するので、図2中の4種のオリゴヌクレオチドのうち、G-T-Gの塩基配列を有するもの(図2中の左側部分の2種)及びG-A-Gの塩基配列を有するもの(図2中の右下側のもの)は、その塩基配列を認識して効率よく共有結合するのに対して、前記した認識配列とは異なるA-T-Gの塩基配列を有するもの(図2中の右上側のもの)はミスマッチとなり、反応が遅く、46時間経過後も8%程度に過ぎない。このように、本発明の化合物が完全に配列を認識していることが判る。

【0028】図2の左下側に示されるオリゴヌクレオチドが最もよくマッチしており、このものをエレクトロスプレー質量分析で分析した結果を図6に示す。この質量分析のスペクトルチャートから、本発明の化合物がDNAに共有結合していることが示された。

【0029】図3は、前記同様に本発明のXがCHでRがアセチル基である化合物(以下、PPDuという。)を用いて試験をした結果を示すものである。前述したように、PPDuはW-W-V(式中、VはA又はG、WはA若しくはT又はUを示す。)の塩基配列を認識するので、図3中の4種のオリゴヌクレオチドのうち、T-T-Gの塩基配列を有するもの(図3中の下側部分の2種)及びA-T-Gの塩基配列を有するもの(図3中の左上側のもの)は、その塩基配列を認識して効率よく共

有結合するのに対して、前記した認識配列とは異なるG-T-Gの塩基配列を有するもの(図3中の右上側のもの)はミスマッチとなり、反応が遅く、22時間経過後も26%程度に過ぎない。このように、本発明の化合物が完全に配列を認識していることが判る。

【0030】図4は、同様の試験を長鎖のDNAを用いて作った結果を示している。この試験に使用したDNAの全塩基配列は配列表の配列番号2に示されている。図4の右側はPPDuを用いた結合を、左側はIPDuを用いた場合を示している。図4の右側においては、部分配列がW-W-Gである箇所において本発明のPPDuによるアルキル化が生起していることが判った。また、図4の左側においては、部分配列がG-W-Gである箇所において本発明のPPDuによるアルキル化が生起していることが判った。なお、図4の試験においては、IPDu又はPPDuの濃度を、4、8、16、及び、32μMの4段階で行っている(各濃度においてディスタマイシン(Dist)の濃度をそれぞれ8、16、32、及び、64μMとした。)

【0031】図5は、本発明の化合物としてPy-Py-Py-γ-Im-Py-Py-Duを用いて、392bp(I'DNA(配列表の配列番号1に示す。))と449bp(II'DNA(配列表の配列番号3に示す。))を用いて前記と同様な試験をした結果を示すものである。PPDuの認識配列であるW-W-Aの部分配列を有する部分においてアルキル化が生起しているスポットが観察できた。この試験においては、本発明の前記の化合物を濃度、0.25、0.5、1.0、及び、2.0μMの4段階で使用した。

【0032】以上の試験からも明らかなように、本発明の化合物は、遺伝子の特定の塩基配列の部分に特異的にアルキル化し、当該遺伝子の発現を阻害することができる。即ち、本発明の化合物は、遺伝子の標的とする塩基配列の部分の特異的にアルキル化することができ、当該アルキル化により遺伝子の機能を阻害することにより、その発現を制御することができる。図7に本発明の好ましい化合物を例示されている。

【0033】また、本発明の化合物は、ピロールイミダゾール系のポリアミドであり、細胞透過性に優れており、生体へ通常の方法で投与することにより、標的の遺伝子の特異的に制御することができるものである。したがって、本発明は、本発明の化合物を用いた遺伝子の特異的なアルキル化剤、それを用いた遺伝子の制御方法、及び、がんなどの遺伝子に誘発される各種疾患を治療又は予防する医薬組成物を提供するものである。

【0034】

【実施例】次に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0035】実施例1(XがNでRがアセチル基の化合

## 物の製造)

## (1) アルキル化部 (Du) の製造

窒素雰囲気下、デュオカルマイシンB<sub>2</sub> 122 mg (0.209 mmol) をメタノール10 ml とアセトニトリル10 ml の混合物に溶解し、0℃に冷却し、これに28%ソディウムメトキサイドのメタノール溶液120 μl を滴下した。反応混合物を0℃で11時間攪拌した後、35 ml の0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.3) を加えた。メタノールを留去し、食塩を加え、残渣を酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮した。濃縮物をカラムクロマトグラフィー (クロロホルム: アセトン = 1:0~3:1) で精製した。44 mg の黄色の生成物を得た (収率77%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.06 (s, br, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.01 (s, br, 1H), 3.79 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.66 (d, J=11.0 Hz, 1H), 3.01 (m, 1H), 2.04 (dd, J=3.7 Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.00 (dd, J=3.7 and 4.9 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 193.64, 176.55, 174.95, 168.32, 166.84, 108.82, 98.65, 71.14, 53.2

HREIMS m/e C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 計算値: 211.0957

実測値: 211.0960

[0037] (b) 前記の (a) で得られたアセチル体0.950 g (4.50 mmol) を16 ml のメタノール中にとり、2N-NaOH 16 ml を加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌した。メタノールを留去し、残った水溶液を4℃に冷却し、1N-HCl をもちいて※

HREIMS m/e C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 計算値: 183.0644

実測値: 183.0666

[0038] (c) 前記の (b) で得られた遊離カルボン酸体0.551 g (3.01 mmol) の30 ml DMF 溶液に、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 0.488 g (3.61 mmol) とジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 0.744 g (3.61 mmol) の混合物を加えた。混合物を室温で40時間攪拌した後、メチル 4-アミノ-1-メチルピロール-2-カルボン酸エステル塩酸塩0.574 g (3.01 mmol) とDMF 10 ml 及び15 ml のDIEAの混合物を加えた。混合物を室温で4日間攪拌した。濾過して、DMFを留去し、200 ml の酢酸エチルを加★40

HREIMS m/e C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 計算値: 319.1280

実測値: 319.1277

[0039] (d) 前記の (c) で得られたアミド-メチルエステル体0.500 g をメタノール12.5 ml に溶解し、12.5 ml の2N-NaOHを加えた。その溶液を室温で終夜攪拌した。メタノールを留去し、水20 ml を加え濾過し、得られた水溶液を1N塩酸でpH 2に調整した。沈殿物を集め乾燥して、目的の遊離カルボン酸体0.439 gを得た (収率92%)。 ☆

HREIMS m/e C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 計算値: 305.1124

\* 1, 51.90, 30.49, 24.39, 22.60, 20.98

FABMS m/e 275 [M+1]

[0036] (2) 1m-Pyの製造

(a) 窒素雰囲気下、4 ml の無水酢酸に、4-アミノ-N-メチル-イミダゾール-2-イル-カルボン酸エチルエステル塩酸塩3.025 g (14.7 mmol) とピリジン10 ml 及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 15 ml の混合物を加えた。反応混合物を1時間室温で攪拌し、約15 ml に濃縮した。100 ml の水を加えた後、混合物を酢酸エチルで抽出した。抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、-30℃に冷却して、目的のN-アセチル体2.64 gを得た (収率85%)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10.55 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 4.25 (q, J=7.0 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.28 (t, J=7.0 Hz, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 167.00, 158.43, 137.58, 130.77, 114.62, 60.47, 35.32, 22.60, 14.02

※ pH 2に調整した。沈殿物を集め水で洗浄し、乾燥して遊離カルボン酸0.763 gを白色固体として得た (収率93%)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10.45 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.97 (s, 3H)

実測値: 183.0666

30★えた。濾過して沈殿物を除き、酢酸エチル溶液を1N塩酸で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、-30℃に冷却して、目的のアミド-メチルエステル体0.522 gを得た (収率54%)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10.19 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.50 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.68 (d, J=1.8 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.01 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 167.24, 160.73, 155.86, 136.15, 133.78, 121.99, 120.95, 118.78, 114.01, 108.69, 50.93, 36.23, 34.88, 22.69,

実測値: 319.1277

☆ <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.18 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 2.01 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 167.23, 161.86, 155.79, 136.15, 133.83, 121.69, 120.42, 119.82, 113.94, 108.74, 36.18, 34.88, 22.69,

【0040】(e) 前記の(d) で得られた遊離カルボン酸体0.135g (0.44mmol) と1,1'-カルボニルジイミダゾール84mgを5mlのDMFに溶解した。室温で5時間攪拌した後、反応混合物を100mlの冷水に注いだ。沈殿物を集め、塩化メチレンで洗浄し、真空で乾燥し、目的の活性アミド体0.108gを得た(収率69%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.18 (s, 2H), \*

HREIMS m/e  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_3$  計算値: 355.1393

#### 【0041】(3) アミド化

前記の(1) で得られた化合物19.4mg (0.071mmol) の0.55ml DMF溶液に、窒素雰囲気下、 $-40^\circ\text{C}$ で60%水素化ナトリウム7.2mg (0.180mmol) の0.5ml DMF溶液を滴下した。混合物を $-40^\circ\text{C}$ ~ $-20^\circ\text{C}$ で2.5時間攪拌した後、 $-50^\circ\text{C}$ に冷却し、前記(2)(e) で得られた活性アミド体41.8mg (0.118mmol) の1.0ml DMF溶液を滴下した。反応混合物を $-50^\circ\text{C}$ ~ $-30^\circ\text{C}$ で3時間攪拌した。冷たい0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)の20mlを添加した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、残渣をTLCで酢酸エチルを用いて溶出して、目的のIPDu15.1mgを得た(収率34%)。

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 8.68 (s, 1H), 7.68 (s, br, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.51 (d, J=1.81Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.10 (s, br, 1H), 4.20 (dd, J=5.5 and 4.9Hz, 1H), 4.02 (d, J=11.6Hz, 1H), 3.98 (s, 3H) \*

HREIMS m/e  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$  計算値: 196.0848

【0043】(b) 実施例1の(2)の(b)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率84%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.80 (s, 1H), 7.24 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.62 (d, J=1.8Hz, 1H), 3.77 (s, 3H) \*

HREIMS m/e  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$  計算値: 182.0691

【0044】(c) 実施例1の(2)の(c)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率51%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.87 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 7.43 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.12 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.88 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.82 (d, J=2.0Hz, 1H), 3.82 \*

HREIMS m/e  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$  計算値: 318.1328

【0045】(d) 実施例1の(2)の(d)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率87%)。

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.83 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 7.39 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.12 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.82 (dd, J=2.0 and 1.5Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 1.96 ◆

HREIMS m/e  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4$  計算値: 304.1171

実測値: 305.1123

\* 8.24 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.10 (d, J=1.9Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.02 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 167.28, 156.76, 156.02, 137.76, 136.18, 133.50, 129.75, 124.42, 122.94, 119.90, 118.52, 114.34, 112.13, 36.32, 34.96, 22.70

実測値: 355.1402

※ H), 3.78 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 2.86 (m, 1H), 2.21 (d, J=3.7Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.24 (t, J=4.3Hz, 1H)

HRFABMS m/e 562.2054 [M+H] ( $\text{C}_2$ ,  $\text{H}_2$ , N, O, とした計算値: 562.2050)

【0042】実施例2 (XがCHで、Rがアセチル基の化合物の製造)

#### (1) Py-Pyの製造

(a) 実施例1の(2)の(a)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率91%)。

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl $_3$ )  $\delta$ : 7.79 (s, 1H), 7.26 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.60 (d, J=1.8Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 166.52, 160.70, 122.81, 120.28, 118.56, 107.58, 50.87, 36.06, 22.95

実測値: 196.0837

★ H), 1.93 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 166.49, 161.83, 122.53, 119.83, 119.57, 107.61, 36.06, 22.95

計算値: 182.0691

実測値: 182.0682

☆ (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 1.95 (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 166.42, 160.74, 158.36, 122.84, 122.45, 122.13, 120.70, 118.48, 118.12, 108.36, 103.84, 50.87, 36.08, 36.00, 22.98

計算値: 318.1328

実測値: 318.1310

◆ (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 166.42, 161.88, 158.33, 122.53 (d), 122.12, 120.24, 119.47, 118.05, 108.36, 103.82, 36.04, 35.98, 23.00

15

【0046】(e) 実施例1の(2)の(e)と同様にしてピロール誘導体を得た(収率74%)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.98 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.75 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.68 (t, J=2.0 and 1.0Hz, 1H), 7.13 (t, J=2.0 and 1.0Hz, 2H), 6.93 (d, J=1.5Hz, 1H), 6.88 (d, J=1.5Hz, 1H), 3.90 \*

HREIMS m/e C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 計算値: 354.1440

【0047】(2) アミド化

実施例1の(3)と同様にしてピロール誘導体PPDuを得た(収率26%)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.28 (s, br, 1H), 7.78 (s, br, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.20 (d, J=5.5 and 4.9Hz, 1H), 4.00 (d, J=12.0Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.90-2.86 (m, 1H), 2.21 (dd, J=3.7Hz, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 0.86 (t, J=4.3Hz, 1H)

HRFABMS m/e 561.2089 [M+H]<sup>+</sup> (C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> とした計算値: 561.2098)

【0048】実施例3 (アルキル化の試験)

DNA 8量体をDNA自動合成機で合成した。DNAオリゴヌクレオチドのアルキル化は次のようにして行った。本発明の化合物(0.1mM)、ディスタマイシンA(0.1mmol)及びDNA 8量体(1mM)を50mMの炭酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に加え、0℃で種々の時間インキュベートした。反応をHPLC(ケムコボンド 5-ODS-H カラム)でモニター※30

#### SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation  
 <120> A compound to alkylate for the specific sequence in DNA and its method of preparation  
 <130> PA906342  
 <160> 3  
 <210> 1  
 <211> 450  
 <212> DNA  
 <213> pUC 18  
 <400> 1  
 aqaatcaagg gataacgcaq gaaagaacat gtgaqcaaaa gqccagcaaa agqccagqaa 60  
 ccqtaaaaag gccgcgtttc tqcgttttt ccataaggctc cgcctccctg acgaqcatca 120  
 caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggaactataa gataccagqc 180  
 gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccgqata 240  
 cctgtccgcc ttttccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatqctcac qctgtaqgta 300  
 tctcaqttcg gtgaaggtcg ttcctccaa gctgqctgt gtgcacgaac ccccggttca 360  
 gcccgaccgc tqcgccttat ccqtaacta tcgtcttgaq tccaaccgqg taagacacga 420  
 cttatcgcca ctgacagcag ccactggtaa 450  
 <210> 2

16

実測値: 304.1167

\* (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 1.96 (s, 3H)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 166.47, 158.46, 156.75, 137.70, 129.67, 124.32, 123.88, 122.25, 122.13, 119.68, 118.56, 118.40, 111.69, 104.04, 36.23, 36.10, 23.02

実測値: 354.1442

10※した。溶出液は0.05Mギ酸アンモニウムと0~50%アセトニトリルのリニアな傾斜(0~40分)で、流量は1.0ml/分であった。254nmで検出した。本発明のIPDuを用いた場合の結果を図2に示す。本発明のPPDuを用いた場合の結果を図3に示す。

【0049】実施例4 (IPDu及びPPDuによる長鎖DNAのアルキル化の試験)

5'-テキサス レッド-エンド-モディファイド 450bp DNAをPCR法により調製した。5'-テキサス レッド-エンド-モディファイドpUC18の378~395及びpUC18の逆の1861~1881を用いた。実施例3と同様にしてアルキル化の試験をした。結果を図4及び5に示す。

【0050】

【発明の効果】本発明は、特定の塩基配列に特異的にアルキル化することができる化合物を提供する。本発明の化合物は、遺伝子中の標的とした塩基配列に選択的かつ特異的にアルキル化することができ、これにより当該塩基配列を有する遺伝子の発現を制御し、遺伝子が誘発する各種疾患の治療・予防などに有用である。

【配列表】

17  
 <211> 450  
 <212> DNA  
 <213> pUC 18  
 <400> 2  
 tgtaaaacga cggccagtgc caagcttqca tgcctgcagg tcgactctag aggatccccg 60  
 qgtaccgaqc tcqaattcgt aatcatggtc ataactgttt cctgtgtgaa attgttatcc 120  
 qctcacaatt ccacacaaca tacgaagccg aaqcataaaq tgtaaagcct ggggtgccta 180  
 atgaagtgaqc taactcacat taattgcgtt gcqctcactg cccqctttcc agtcgggaaa 240  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagggc gtttgcgtat 300  
 tgggcgcgtc tccgcttctc cgtcactga ctcgtgcgc tcggtcgttc ggtcgcgcgc 360  
 agcgggtatca gctcactcaa agcgcgtaat acggttatcc acagaatcaq gggataacgc 420  
 aggaaagaac atgtgaqcaa aaqccaqca 450  
 <210> 3  
 <211> 426  
 <212> DNA  
 <213> pUC 18  
 <400> 3  
 ggtcacagct tgtctgtaag cggatgcccg gaqcaqaca gcccgtcagg gcgcgtcagc 60  
 ggtgtgtgac ggtgtgcggg gctgacttaa ctatgcggca tcagaacaga ttgtactgaq 120  
 a g t g c a c c a t a t g c g g t g t g a a a t a c c g c a c a g  
 a t g c g t a a g g a g a a a t a c c g c a t c a g 180  
 gcgccattcg ccattcaagg tgcgaactg ttgggaaagg cgatcggtgc ggcctcttc 240  
 gctattacgc caqctggcga aaqggggatg tgcgcaagg cgattaagtt ggttaacgcc 300  
 aggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gccaaqcttg catgcctgca 360  
 ggtcgactct agaggaatccc cgggtaccga gctcgaattc gtaatcatgg tcatacgtgt 420  
 ttcctg 426

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本発明の化合物の製造方法を例示したものである。

【図 2】図 2 は、IPDu-Dist によるアルキル化の反応性、ミスマッチのものは反応性低い。

【図 3】図 3 は、PPDu によるアルキル化の反応性、ミスマッチのものは反応性低い。

【図 4】図 4 は、IPDu 及び PPDu による DNA フラグメント (II') を用いた配列の認識を示す。

【図 5】図 5 は、IPDu 及び PPDu による DNA フラグメント (I') 及び (II') を用いた配列の認識を示す。

【図 6】図 6 は、IPDu-Dist-8 量体複合体の 40  
 エレクトロスプレースによるスペクトルチャートを示す。

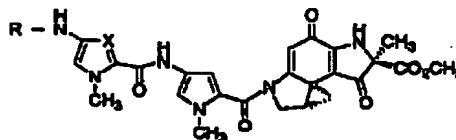
【図 7】図 7 は、本発明の化合物の好ましいものの例示である。

## 【要約】

【課題】 本発明は、塩基対の水素結合のマイナーグループを認識すると共に、塩基と共有結合をし得る化合物を提供する。本発明の化合物は、特定の塩基配列を認識すると共に、隣接する塩基と共有結合により強固に結合し、当該塩基配列を有する遺伝子の発現を制御することができる。

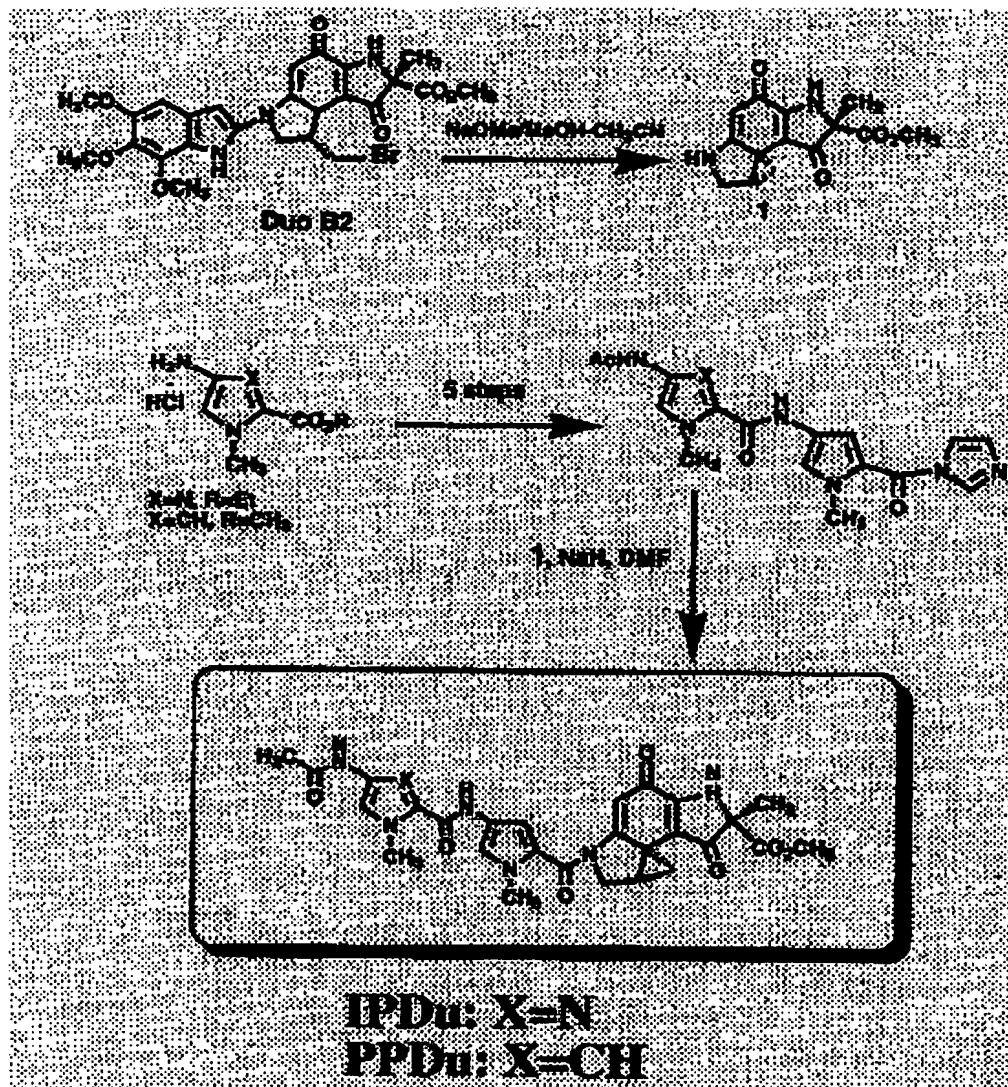
【解決手段】 本発明は、次式 (I)

## 【化 1】

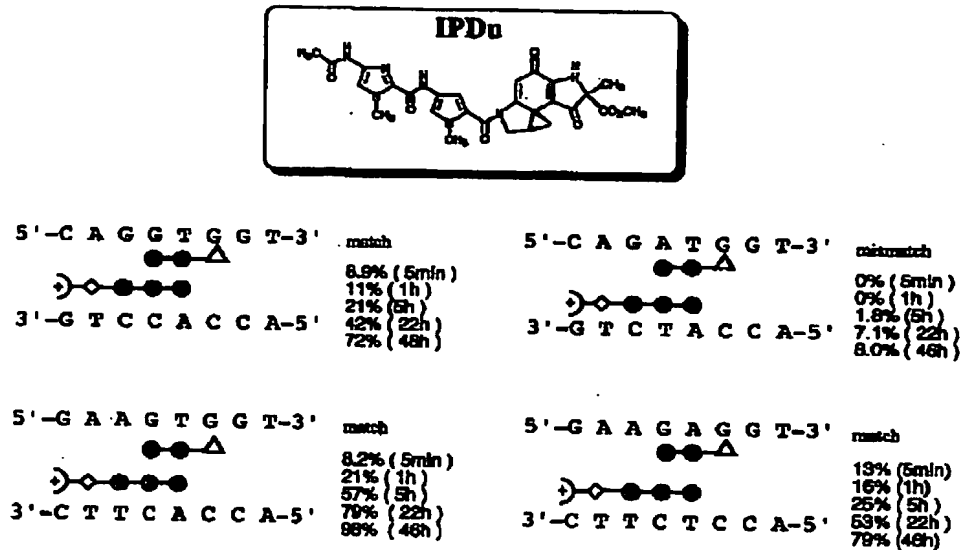


(式中、R は低級アミル基又はポリアミド基を示し、X は窒素原子又は CH を示す。) で表される化合物に関する。また、本発明は、前記一般式 (I) で表される化合物からなる遺伝子のアルキル化剤に関する。

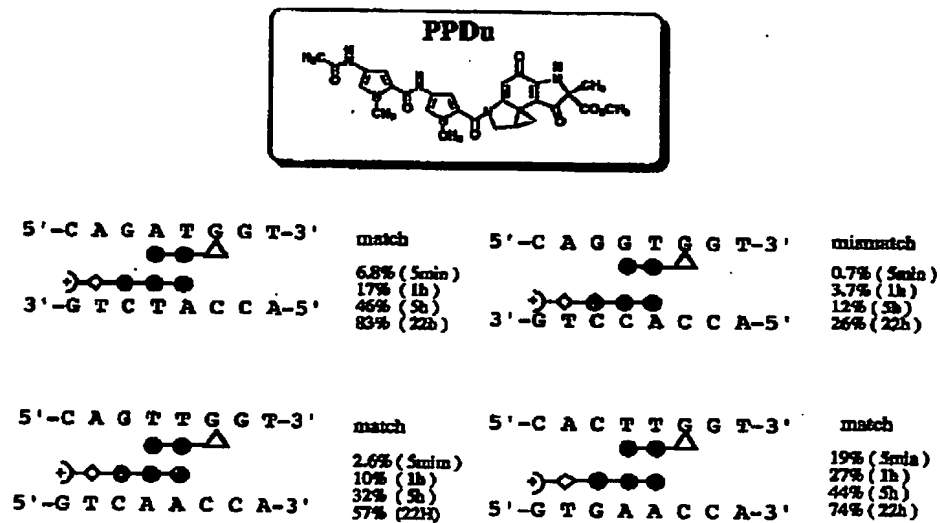
【図1】



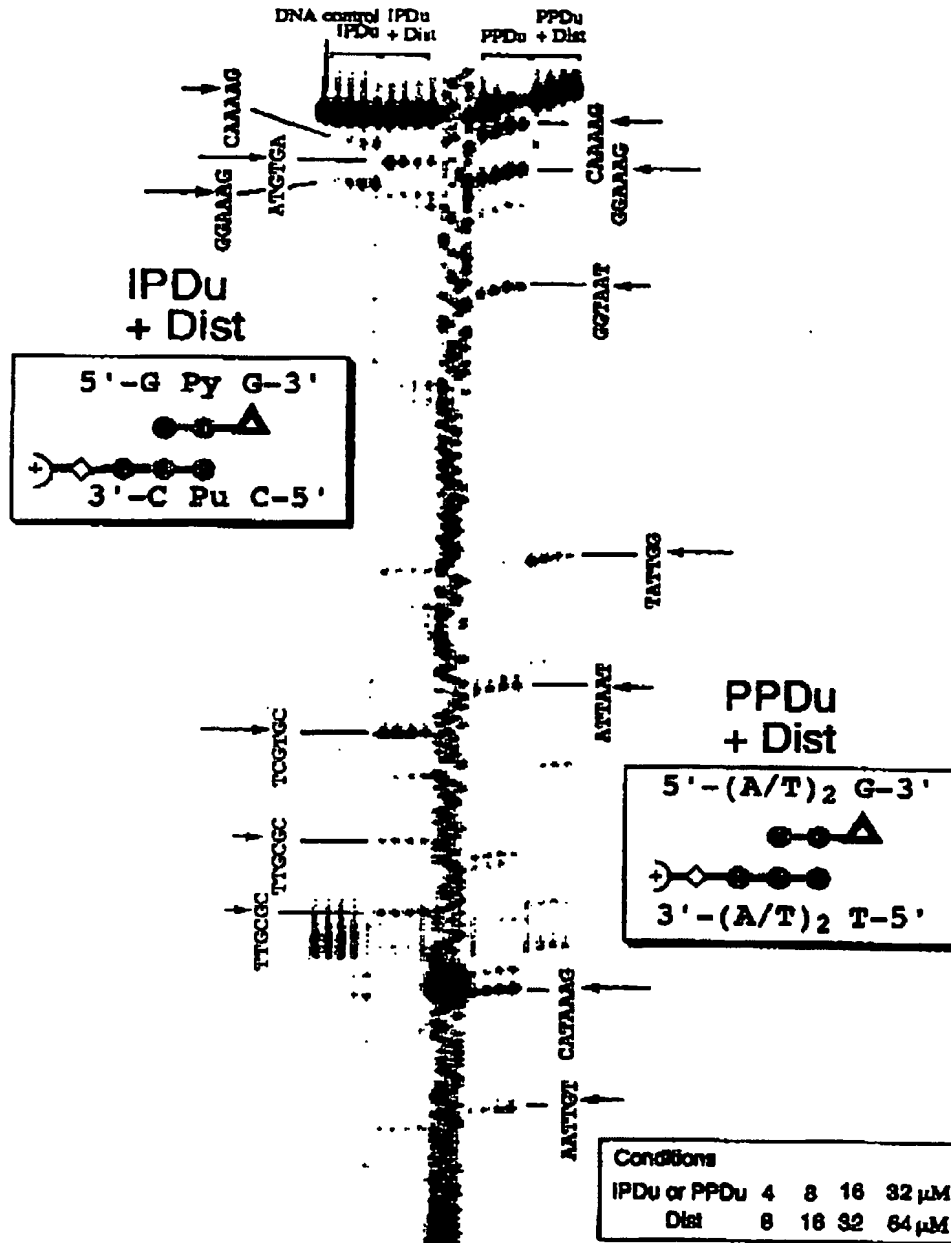
〔図2〕



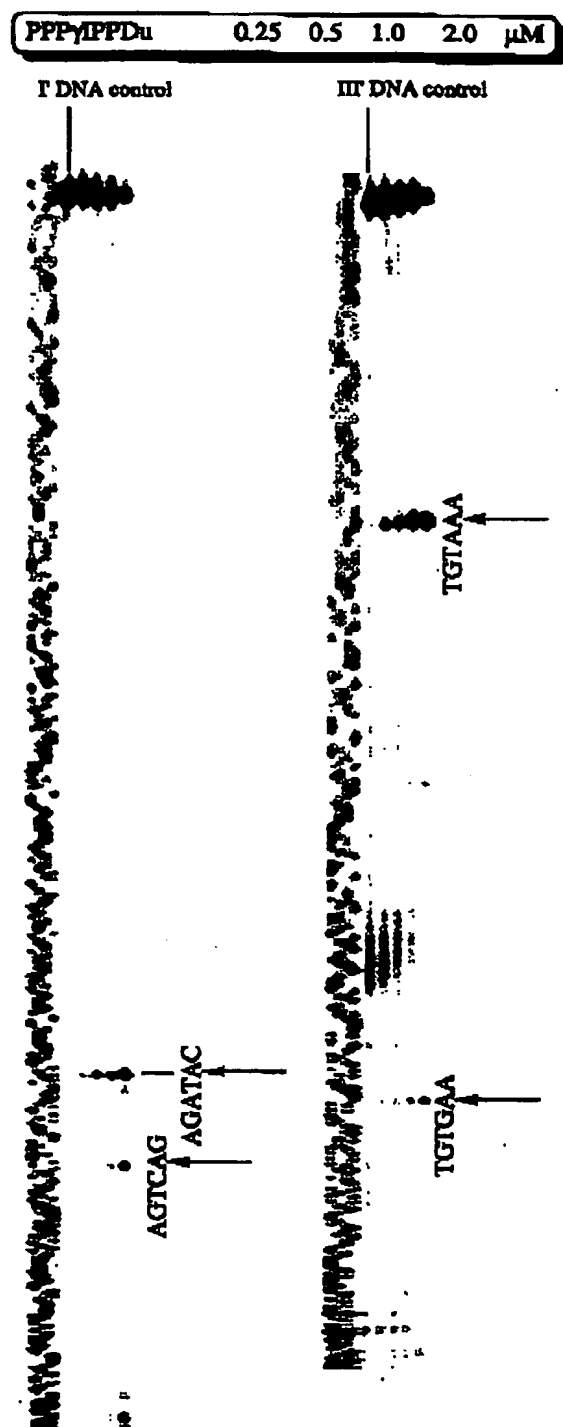
〔図3〕



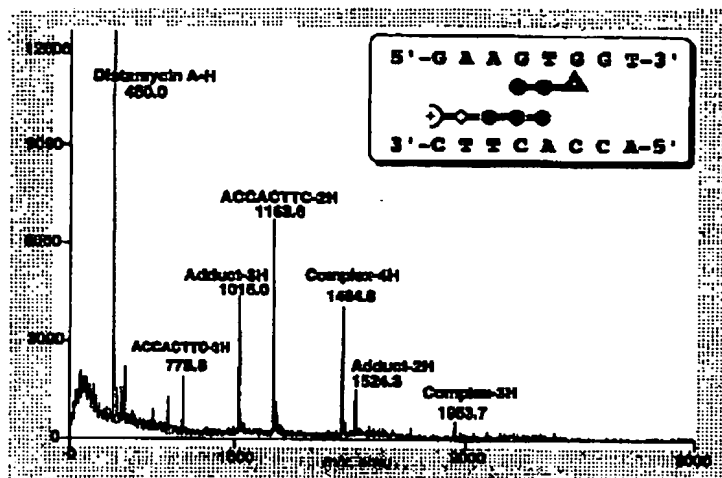
(図4)



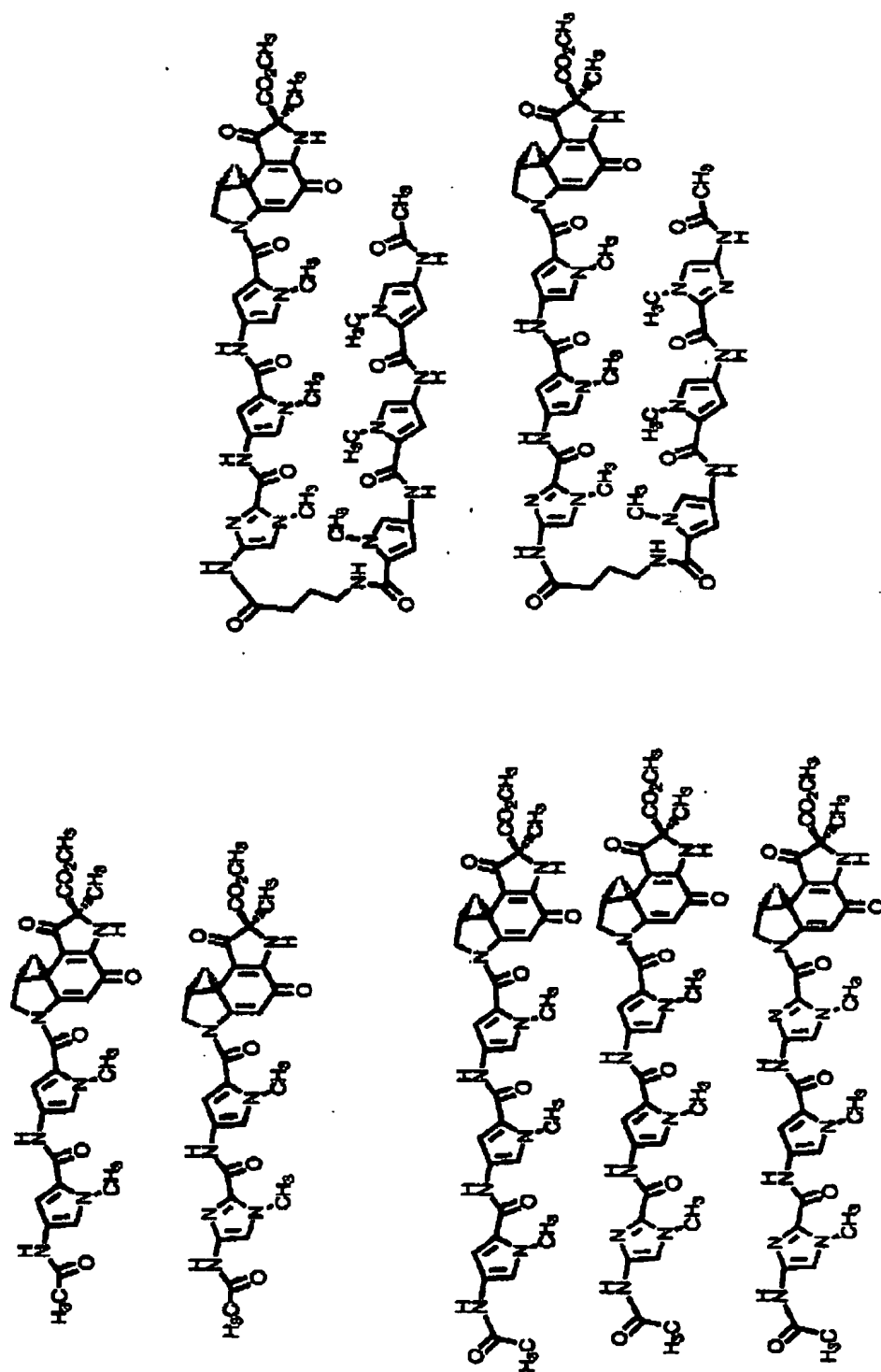
〔図5〕



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>                      識別記号  
C 1 2 N 15/09                  Z N A

F I  
C 1 2 N 15/00                  Z N A A

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B名)

C07D 487/04  
A61K 31/407, 31/4178  
A61P 35/00  
C12N 15/00  
CA (STN)  
REGISTRY (STN)

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成13年7月30日(2001. 7. 30)

【特許番号】特許第3045706号(P3045706)

【登録日】平成12年3月17日(2000. 3. 17)

【特許公報発行日】平成12年5月29日(2000. 5. 29)

【年通号数】特許公報12-21

【出願番号】特願平10-260710

【訂正要旨】錯誤登録につきこれを取り消す。

【国際特許分類第7版】

C07D487/04 137

A61K 31/407

31/4178

48/00

A61P 35/00

C12N 15/09 ZNA

【F I】

C07D487/04 137

A61K 31/407

31/4178

48/00

A61P 35/00

C12N 15/00 ZNA A

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**